



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu **APVV-0444-07**

Úloha katalázo-peroxidázových génov mikrobiálnych izolátov v procesoch degradácie organickej frakcie pevného odpadu

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Bystrík Polek, CSc.**

Príjemca **Ústav molekulárnej biológie**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Ústav molekulárnej biológie, Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava
2. Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava - (2008-2009)
- 3.
- 4.
- 5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- 1.
- 2.
- 3.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- 1.
- 2.
- 3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Bučková, M., Godočíková, J., Zámocký, M., Polek, B. Isolates of Comamonas spp. exhibiting catalase and peroxidase activities and diversity of their responses to oxidative stress. (2010) Ecotox. Environ. Safe 73: 1511-1516.
2. Godočíková, J., Zámocký, M., Bučková, M., Obinger, C., Polek, B. Molecular diversity of katG genes in the soil bacteria Comamonas. (2010) Arch Microbiol. 192: 175-184.
3. Bučková, M., Godočíková, J., Zámocký, M., Polek, B. Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress. (2010) Curr microbiol 61: 241-247.
4. Polek, B. (2008) Soil pollution and response of microorganisms to oxidative stress. In: Soil

Contamination Research Trends. Ed.: Javier B. Dominguez, pp. 119-141. Nova Publishers Science, ISBN 978-1-60456-319-1.

5. Bučková, M., Godočiková, J., Zámocký, M., Polek, B. (2010) Role of catalases in solates of genus Comamonas from polluted environment. In: Microorganisms in Industry and Environment. Ed.: Antonio Mendez-Vilas, pp. 195-198. World Scientific Publishing Co. is already released, ISBN-13: 978-981-4322-10-2.

Uplatnenie výsledkov projektu

Regulácia katalázovej aktivity, vrátane alternatívnych zmien v expresii jednotlivých izoenzýmov nám pomôžu objasniť mechanizmy tolerancie, adaptácie mikroorganizmov a tým porozumieť ekologickým problémom biologickej rovnováhy. Údaje sú použiteľné v oblasti ochrany a tvorby životného prostredia.

Osekvenovali sme katG gény bakteriálnych izolátov, ktoré kódujú syntézu kataláz-peroxidáz získaných zo znečistených prostredí. Ich sekvencie sme zaregistrovali v génovej banke (FJ460594 *Comamonas terrigena* CCM 2409, FJ794695 *Comamonas testosteroni* CCM 1931 a FJ562209 *Comamonas testosteroni* K1) a následne aj v PeroxiBase. Poznatky zo sekvenčných analýz katG génov, najmä ich DNA sekvenčných zmien poskytujú informácie aj o evolučnom potenciáli mikroorganizmov a umožnia predpovedať, ako sa môže sledovaný typ baktérií adaptovať na budúce stresové výzvy prostredia. Posúdenie zmien na genetickej úrovni vo vzťahu k miere a typu znečisteného prostredia umožní odhadnúť stupeň ohrozenia genofondu mikroorganizmov. Je priradované k ekologickým indikátorom ohodnotenia stavu prírody a prispieje k celkovému hodnoteniu kumulatívnych účinkov antropogénnych činností na diverzitu. V roku 1994 bol Slovenskou republikou ratifikovaný „Dohovor o biologickej diverzite“, ktorý zaväzuje vytvoriť podmienky pre ochranu a využívanie zložiek biologickej diverzity.

Skúmanie genetickej diverzity mikroorganizmov v ich prirodzenom prostredí nesie v sebe veľký potenciál pre ich využitie v biotechnológiach. Mikrobiálne izoláty schopné degradovať ťažko rozložiteľné polutanty môžu byť využité pre technológie bioremediácie. Najmä v extrémnych prostrediach sú nachádzané nové neobvyklé formy enzýmov s neočakávanými vlastnosťami. Praktické využitie majú enzýmy s vhodnými vlastnosťami (pH optimum v alkalickej oblasti, tepelná stabilita, atď.).

Výsledky majú pokračovanie v riešení projektu s názvom "Nové mikrobiálne izoláty obsahujúce gény katabolických a detoxikačných dráh a ich využitie v biotechnológii" s ITMS kódom 26240220010, finančne podporovaného EU ktorého sme prijímateľmi a riešiteľmi. Projekt vznikol v rámci podpory výskumu a vývoja v Bratislavskom kraji s cieľom prenosu poznatkov a technológií získaných výskumom do praxe (4.2).

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Zistili sme, že pre prežitie mikrobiálnych izolátov *C. testosteroni* CCM 1931, *C. testosteroni* K3, *C. terrigena* N3H a N1C, *C. terrigena* CCM 2409 ako aj *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* a *Bacillus megaterium*, získaných z prostredia znečistenom ropnými látkami bola dôležitá zvýšená produkcia kataláz a kataláz-peroxidáz. Ochrana jednotlivých izolátov voči zvýšenej koncentrácii peroxidu vodíka (600 mM) sa prejavila značnou diverzitou v expresii kataláz a peroxidáz. Predpokladáme, že rozdielna expresia kataláz a ich izoenzýmov bol výsledok selektívneho tlaku prostredia jednotlivých biotypov. Najväčšie rozdiely medzi jednotlivými izolátmi v citlivosti na toxické účinky H₂O₂ sme pozorovali do strednej exponenciálnej fázy rastu. Osekvenovali sme tri kompletne katG gény, kódujúce katalázu-peroxidázu z kmeňov *Comamonas terrigena* a *Comamonas testosteroni* patriace do skupiny beta-proteobaktérií. Na základe porovnania sekvencií sme fylogenetickou analýzou zistili evolučnú a štruktúrnu diverzitu tohto enzýmu. Ukazuje sa, že osobitá variabilita v sekvenciách génu je dôležitejšia pre aktivity u kmeňov *Comamonas* ako rozdiely v ich promotórových oblastiach. Analyzovali sme význam pozorovanej zvýšenej diverzity C-terminálnej domény s ohľadom na potenciálnu modifikáciu katalytických črt N-terminálnej

domény, ktorá by mohla byť závažná pre tieto pôdne baktérie pri ich vyrovnávaní sa so stresormi. Vedecké ciele stanovené pre dobu riešenia projektu boli splnené.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku
(max. 20 riadkov)

For survival isolates of *C. testosteroni* CCM 1931, *C. testosteroni* K3, *C. terrigena* N3H or N1C, *C. terrigena* CCM 2409, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Bacillus megaterium* selected from polluted environments, the production of catalase and peroxidase activity was important. Protection of isolates to 600 mM H₂O₂ stress was characterized with considerable diversity in catalase and peroxidase responses, that resulted from hydroperoxidase's variant of original isolates, indicating also a selective pressure of environment. The greatest appreciable differences in sensitivity to toxic effect of H₂O₂ treatment of individual isolates was observed until the middle of exponential growth phase. Three complete *katG* genes coding for bifunctional catalase-peroxidase from beta-proteobacterium *Comamonas terrigena* and two related strains of *Comamonas testosteroni* have been cloned and sequenced. The evolutionary and structural diversity of these enzymes is investigated based on multiple sequence alignment and comprehensive phylogenetic analysis. The peculiar variability in gene-coding sequences appears to be more significant for such activity output among *Comamonas* strains than differences in their promoter regions. The functional role of observed increased diversity in the C-terminal domain is discussed with respect to potential modification of catalytic features at the N-terminal domain that could be relevant for these soil bacteria to cope with stressors. Scientific goals specified for the period of this project were filed.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

Ing. Bystrík Polek, CSc.

V Bratislave 28. 01. 2011

Štatutárny zástupca príjemcu

RNDr. Imrich Barák, DrSc.

V Bratislave 28. 01. 2011

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu